

ÜBER DEN GLUCOSE- UND
MITOCHONDRIALEN
ENERGIESTOFFWECHSEL
DES HÜHNERERYTHROZYTEN

Günther Pfann

Diss
München
1985

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

ÜBER DEN GLUCOSE- UND
MITOCHONDRIALEN ENERGIESTOFFWECHSEL
DES HÜHNERERYTHROZYTEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Günther Pfann

aus
Fürth

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:..... Prof. Dr. W. Leidl

Referent:..... Priv.Doiz.Dr.Dr.habil. J. Wittmann

Korreferent:..... Priv.Doiz.Dr.Dr.habil. H. Gerlach

Tag der Promotion:..... 22. Februar 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1. <u>Allgemeiner Teil</u></u>	1
<u>1.1. <u>Der erythrozytäre Glucosestoffwechsel</u></u>	1
<u>1.2. <u>Der aviäre Erythrozyt und sein</u></u> <u> <u>Glucosestoffwechsel</u></u>	7
<u>1.3. <u>Zielsetzung</u></u>	10
<u>2. <u>Eigene Untersuchungen</u></u>	11
<u>2.1. <u>Material und Methoden</u></u>	11
<u>2.1.1. <u>Reagenzien</u></u>	11
<u>2.1.2. <u>Versuchstiere</u></u>	11
<u>2.1.3. <u>Blutuntersuchungen</u></u>	12
<u>Bestimmung der Metaboliten</u>	14
<u>2.1.4. <u>Statistische Berechnungen</u></u>	18
<u>2.2. <u>Ergebnisse</u></u>	19
<u>2.2.1. <u>Metabolische Untersuchungen an</u></u> <u> <u>isolierten Erythrozyten</u></u>	19
<u>3. <u>Diskussion</u></u>	35
<u>4. <u>Zusammenfassung</u></u>	40
<u>5. <u>Literaturverzeichnis</u></u>	42

1. Allgemeiner Teil

1.1. Der erythrozytäre Glucosestoffwechsel

Der Abbau der Glucose erfolgt im wesentlichen über die Reaktionssequenzen des Pentose-Phosphat-Zyklus und der Glykolyse. Entwicklungsgeschichtlich stellt die Glykolyse den älteren Weg dar. Es ist daher verständlich, daß im Pflanzenreich, bei den meisten Prokaryonten sowie bei allen eukaryotischen Zellen der Ablauf der Glykolyse identisch ist.

Ogleich in differenzierten Organismen alle Zellen zur Glykolyse befähigt sind, gibt es nur wenige Zellarten, wie die Nervenzelle oder den Erythrozyten, die auf die Glykolyse angewiesen sind.

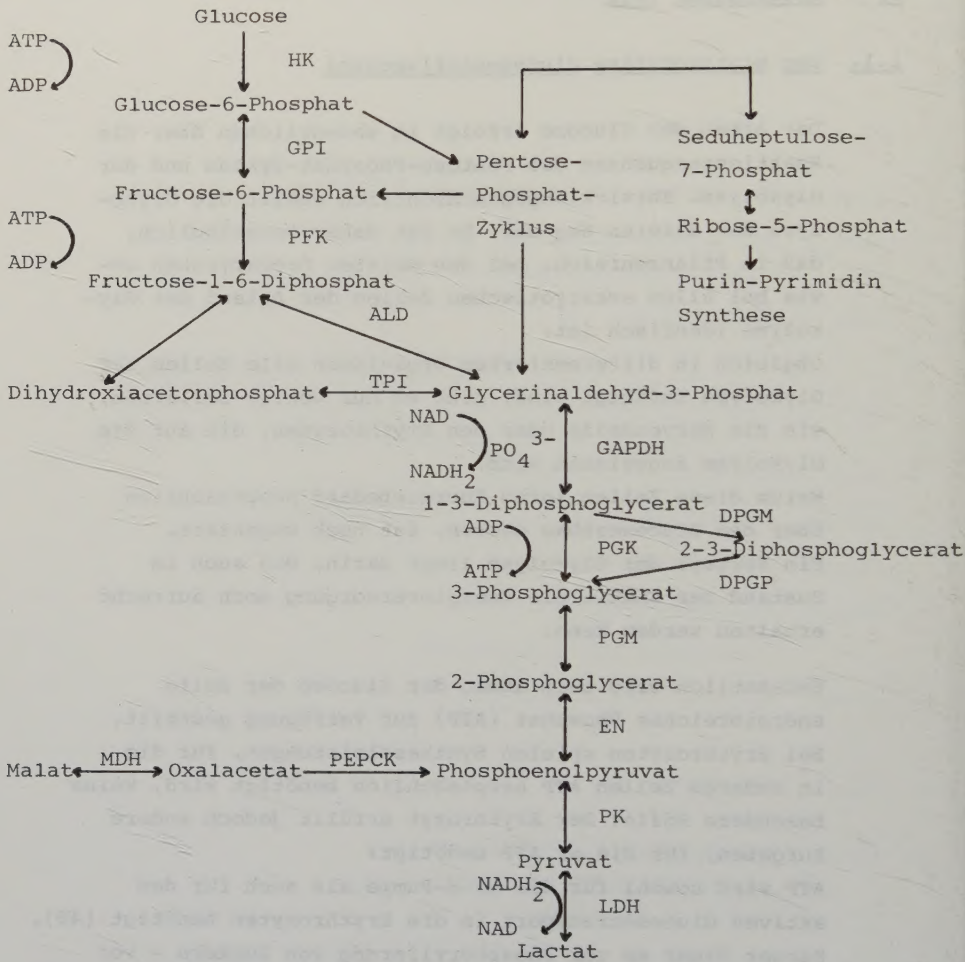
Warum diese Zellen ihren Energiebedarf hauptsächlich über den Glucoseabbau decken, ist noch ungeklärt.

Ein Vorteil der Glykolyse liegt darin, daß auch im Zustand der Anoxie die Energieversorgung noch aufrecht erhalten werden kann.

Bekanntlich wird beim Abbau der Glucose der Zelle energiereiches Phosphat (ATP) zur Verfügung gestellt. Bei Erythrozyten spielen Syntheseleistungen, für die in anderen Zellen ATP hauptsächlich benötigt wird, keine besondere Rolle. Der Erythrozyt erfüllt jedoch andere Aufgaben, für die er ATP benötigt:

ATP wird sowohl für die Na-K-Pumpe als auch für den aktiven Glucosetransport in die Erythrozyten benötigt (48). Ferner dient es zur Phosphorylierung von Zuckern - vor allem Glucose - und zur Erhaltung der Zellgestalt. Außerdem reguliert es die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins und hilft bei Syntheseleistungen von Purin- und Pyrimidinnukleotiden und Glutathion. Ferner wirkt es bei der Regulation der Glykolyse durch allosterische Hemmung der Phosphofruktokinase (PFK) mit (17).

Abb. 1: Der Glucoseabbau in Erythrozyten



- ALD : Aldolase
DPGM : Diphosphoglyceratmutase
DPGP : Diphosphoglyceratphosphatase
EN : Enolase
GPI : Glucose-6-Phosphat-Isomerase
GAPDH : Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HK : Hexokinase
LDH : Lactat-Dehydrogenase
MDH : Malat-Dehydrogenase
PEPCK : Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PFK : Phosphofruktokinase
PGK : Phosphoglyceratkinase
PGM : Phosphoglyceratmutase
PK : Pyruvatkinase
TPI : Triosephosphat-Isomerase

Darüber hinaus dient die Glykolyse aber auch zur Produktion von 2-3-Diphosphoglycerat (2-3-DPG), das zur Regulation der Sauerstoffbindung am Hämoglobin dient (13,34,66,72,81,82,89).

GREENWALD (40) hat das Vorkommen von 2-3-DPG als erster in Schweineerythrozyten 1925 beschrieben. 2-3-DPG wird aus 1-3-DPG über die Diphosphoglyceratmutase gebildet und kann über die Diphosphoglyceratphosphatase in 3-Phosphoglycerat übergeführt werden (Abb. 1). Nach RAPOPORT und NIERADT (79) geht der überwiegende Anteil der Glykolyse über den 2-3-DPG-Seitenweg.

Auffallend ist, daß die Höhe der 2-3-DPG-Konzentration in Säugetiererythrozyten unterschiedlich groß ist. Sie beträgt beim Menschen 4 mmol/l und bei neugeborenen Ratten 0,9 - 2,7 mmol/l, während dagegen bei 3 Wochen alten Ratten Werte um 10,5 mmol/l gefunden werden (87). Es gibt sogar Werte, die darüber noch hinaus gehen (5, 77,87,88). Im Gegensatz dazu steht, daß Erythrozyten erwachsener Vögel einen kaum meßbaren 2-3-DPG-Spiegel aufweisen, obwohl beim embryonalen Küken eine relativ hohe 2-3-DPG-Konzentration gefunden wurde (55).

Ein charakteristisches Merkmal der Säuger-Erythrozyten besteht darin, daß sie keine Mitochondrien besitzen. Damit entfällt bei ihnen die Möglichkeit, das bei der Glykolyse gebildete Lactat in den Zitratzyklus einzuschleusen. Gleichzeitig entfällt aber auch die Regulation der Glykolyse über den jeweils verfügbaren Sauerstoff (Pasteureffekt).

Der Umfang der Glykolyse wird von bestimmten Enzymen reguliert. Im Erythrozyten befinden sich die Reaktionssequenzen auf der Stufe der Hexokinase (HK), der Phosphofructokinase (PFK) und der Pyruvatkinase (PK) nicht im thermodynamischen Gleichgewicht (2,18,19,20,21,63, 64,75,76,78).

Von den vorhergehend genannten Enzymen weist die Hexokinase im Säugererythrozyten die geringste Aktivität auf. Damit stellt sie den limitierenden Schritt für den Glucoseabbau dar (66).

Zu erwähnen ist noch, daß die HK durch oxidiertes Glutathion gehemmt wird (37). Diesen hemmenden Effekt versucht die Zelle dadurch zu beseitigen, indem das oxidierte Glutathion entweder reduziert oder aus der Zelle entfernt wird.

Eine zentrale Bedeutung beim Glucoseumsatz im Säugererythrozyten kommt dem pH-Wert zu. Mit steigendem pH-Wert steigt auch der Glucoseumsatz (64,70). Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Aktivitätsmaxima der HK und PFK bei pH 7,8 bzw. 8,0 liegen (21,64,69,70,75). Eine weitere Kontrolle der Glykolyse im Erythrozyten erfolgt über die Konzentration des anorganischen Phosphates. Den hierdurch regulierten Schritt stellt die PFK dar, deren Aktivität durch ATP gehemmt wird (17). Anorganisches Phosphat hebt die ATP-Hemmung durch kompetitive Hemmung auf.

Über hormonelle Regulationseinflüsse auf den Glucoseumsatz in Erythrozyten ist bekannt, daß Adrenalin die Glykolyse wie in anderen Zellen stimuliert (18). Dieser Effekt wird durch die Aktivierung der HK ausgelöst. Uneinheitlich sind die Meinungen über den Einfluß von Schilddrüsenhormonen auf die Glykolyse beim Erythrozyten (67). CALESNICK et al. (22) fanden bei Kaninchenerythrozyten nach Applikation von L-Trijodthyronin nach 24 Stunden einen beschleunigten Glucoseabbau. CREVASSE et al. (25) fanden demgegenüber keinen Einfluß auf die Glykolyse.

Der zweite, die Glucose abbauende Stoffwechselweg ist der Pentose-Phosphat-Zyklus (PPZ), der auf der Stufe von Glucose-6-Phosphat aus der Glykolyse abzweigt und die bei ihm entstehenden Produkte entweder wieder in die Glykolyse zurückführt oder zur Purinsynthese einsetzt (Abb. 1). Literaturangaben zufolge sind alle Enzyme des PPZ im Erythrozyten vorhanden (29,32,83).

Die Bedeutung des PPZ liegt in der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH. Dieses NADPH wird u.a. verbraucht, um Glutathion in der Zelle in reduziertes Glutathion zu überführen (36). Dieses reduzierte Glutathion gibt sein Elektron an freie Radikale ab und schützt so die Zelle vor deren Angriffen. NADH kann nicht wie NADPH als Wasserstoff-Donator bei der Glutathionreduktase eingesetzt werden. Da die Halbwertszeit für Glutathion nur 4 Tage beträgt und die Erythrozytenmembran für Glutathion nicht permeabel ist, muß Glutathion dauernd neu gebildet werden (58).

NADPH wird ebenso wie NADH für die Funktion der Katalase benötigt, deren peroxidatische Wirkung darin besteht, die Zerlegung von Wasserstoffsuperoxid in Wasser und Sauerstoff zu katalysieren. Dabei wird der entstehende Sauerstoff beseitigt und das Hämoglobin in der reduzierten Form gehalten. NADPH dient ebenfalls als Substrat für die NADPH-Methämoglobin-Reduktase, die das Methämoglobin wieder in die reduzierte Form überführt, sodaß das Hämoglobin wieder zum Sauerstofftransport zur Verfügung steht.

Normalerweise beträgt der Anteil des PPZ am Gesamtglucoseumsatz im Säugererythrozyten nur ca. 10% (2). Durch den Zusatz von Methylenblau, das ein Oxidationsmittel ist und somit Elektronen aufnehmen kann, kann der Anteil des PPZ um das 20-fache gesteigert werden (2,4).

Diese Steigerung des PPZ kommt nach ALBRECHT et al. (2) dadurch zustande, daß der NADP/NADPH - Quotient zu Gunsten des NADP verschoben wird, und somit die hemmende Wirkung des NADPH auf den PPZ abnimmt.

Theoretische kann der PPZ auch zur Nukleosidbildung beitragen. Dies geschieht dadurch, daß Glucose zunächst in Seduheptulose-7-Phosphat und dann in Ribose-5-Phosphat übergeführt wird (Abb. 1). Dieses Ribose-5-Phosphat wird dann zur Purinsynthese verwendet. RAPOPORT (75) hat aber gezeigt, daß die Nukleinsäuresynthese in den Erythrozyten von untergeordneter Bedeutung ist. KIM et al. (52,53,54) konnten hingegen zeigen, daß den Nucleosiden bei Schweineerythrozyten eine zentrale Bedeutung zukommt. So können die Erythrozyten des erwachsenen Schweines keine Glucose mehr verstoffwechseln und decken ihren Energiebedarf hauptsächlich über die Nucleoside. Während der Passage durch verschiedene Organe nehmen diese Erythrozyten Nucleoside auf, die ihnen dann zur Energieversorgung dienen.

Aus den obigen Ausführungen ist ersichtlich, daß sowohl die Glykolyse als auch der Pentose-Phosphat-Zyklus im Stoffwechsel des Erythrozyten eine wichtige Rolle spielen. Die Hauptaufgabe der Glykolyse besteht in der Bildung von ATP für die Energieversorgung und in der Bereitstellung von 2-3-DPG zur Sauerstoffregelung, während der Pentose-Phosphat-Zyklus für die Bereitstellung von NADPH wichtig ist.

1.2. Der aviäre Erythrozyt und sein Glucosestoffwechsel

Vogelerythrozyten enthalten im Gegensatz zu den Erythrozyten der Säugetiere Mitochondrien. Die Zahl der Mitochondrien ist wesentlich geringer als in anderen Organen, und die Form der Cristae ist nicht besonders ausgeprägt. Daraus resultiert ein wesentlich geringerer Sauerstoffverbrauch als bei anderen mitochondrienhaltigen Zellen (14,87,93,94). Die Versuche von DAJANI und ORTEN (27), SCHWEIGER (87) sowie von RUBINSTEIN und DENSTEDT (83) zeigen, daß dennoch eine gewisse Mitochondrienaktivität vorhanden ist. Danach sind sowohl die Metaboliten als auch die Enzyme des Zitratzyklus in den Vogelerythrozyten enthalten.

Auch in der Ausbildung eines Zellkerns beim Vogelerythrozyten zeigt sich ein weiterer Unterschied zu denen des Säugetiers. Auch diese zelluläre Struktur zeichnet sich durch eine geringere biochemische Aktivität aus. So ist in ausgereiften Erythrozyten kaum noch eine Synthese von RNS und Proteinen festzustellen (23,24,28,86). Bei Erythroblasten dagegen scheint eine höhere Syntheseleistung noch möglich zu sein.

Der Glucosestoffwechsel in aviären Erythrozyten ist seit langem Gegenstand von Untersuchungen. Dabei ist immer noch nicht geklärt, ob Hühnererythrozyten Glucose umsetzen. In der Literatur ist die Meinung hierüber nicht einheitlich. Verschiedene Autoren sind der Auffassung, daß Hühnererythrozyten Glucose umsetzen können (8,12, 38,39,59,100), andere sind gegenteiliger Auffassung (9,10,11, 16,68,83). BELL (9,10) konnte zeigen, daß die glykolytische Aktivität früherer Untersuchungen nicht auf die Erythrozyten, sondern auf die Leukozyten zurückzuführen war, mit denen die Erythrozyten noch verunreinigt waren. Interessant waren dann seine Untersuchungen (11), die nach 3-maligem Waschen der Erythrozyten keine

Leukozyten mehr enthielten und auch keine Glykolyse mehr zeigten. Aus diesen Ergebnissen folgte BELL (11), daß das Fehlen von 2-3-DPG auf das Unvermögen zur Glykolyse im Hühnererythrozyten zurückzuführen sei. Ebenfalls keine glykolytische Aktivität war mehr festzustellen, wenn die Erythrozyten im Serum suspendiert worden waren. Einer älteren Studie von GERLACH et al. (38) zufolge sollen Hühnererythrozyten in Krebs-Puffer aber zum Glucoseabbau befähigt sein. GUEST et al. (41) vertraten die Meinung, daß die im Vollblut festgestellte glykolytische Aktivität in erster Linie auf die beim Vogel besonders hohe Aktivität der Leukozyten zurückzuführen ist. Sie schreiben jedoch auch den Erythrozyten eine gewisse glykolytische Aktivität zu. Daß Leukozyten des Menschen auch Glucose abbauen können, ist bekannt. Ihre Aktivität ist mit 5-10% am Gesamtumsatz aber sehr gering.

Neuere Untersuchungen haben dann allerdings ergeben, daß Erythrozyten von Enten (100) und von Gänsen (62,101) Glucose abbauen. KLINGER (55) konnte zeigen, daß Erythrozyten von Hühnerembryonen Glucose verstoffwechseln können, während Erythrozyten von erwachsenen Hühnern dazu nicht mehr in der Lage sind.

Auffallend ist die geringe Glucosekonzentration in den Vogelerythrozyten. Nach MASING (61) macht die in Erythrozyten vorhandene Glucose nur etwa 1% des Blutzuckerspiegels aus und fällt durch Blutentnahmen noch weiter ab. Nach KREGENOW (56) ist die geringe Glucosekonzentration in den Erythrozyten auf die geringe Durchlässigkeit der Zellmembran für Glucose zurückzuführen, die beim Vogel geringer ist als beim Menschen. WHITFIELD und MORGAN (97) sowie BEUTLER und SRIVASTAVA (15) stellten an Gänseerythrozyten fest, daß der Glucosetransport durch die Erythrozytenmembran der limitierende Schritt für den Glucoseabbau ist. Genauere Vorstellungen über

den Glucosetransport in aviäre Erythrozyten sind im Gegensatz zum Humanerythrozyten, bei dem der Transport durch die Bindung des Zuckers an die innere Membran gehemmt wird (48,95), nicht bekannt. In diesem Zusammenhang wird dem Energiestatus beim Humanerythrozyten eine große Bedeutung beigemessen. So konnte durch ATP-Zugabe die Transportrate von 20%, auf die sie durch längere Lagerung oder durch Zugabe von Jodacetamid abgefallen war, wieder auf 100% angehoben werden. Dieser Befund ist überraschend, da extrazelluläres ATP nicht in die Erythrozyten diffundieren kann.

WHITFIELD und MORGAN (97) konnten zeigen, daß der Glucosetransport bei Gänseerythrozyten durch Catecholamine gesteigert werden kann. Ähnlich wirkte sich auch die Ausschaltung der oxidativen Phosphorylierung durch Zusatz von Cyanid oder Dinitrophenol aus. Den gleichen Effekt hatte auch eine Anoxie durch Begasen mit Stickstoff und eine Blockierung der SH-Gruppen durch N-ethylmaleimide (61,71,91,92,97,99,101).

Geht man von der Vorstellung aus, wie sie vor allem von BELL (11) vertreten wird, daß Hühnererythrozyten keine Glucose verstoffwechseln können, so bleibt die Frage offen, woher sie ihre Energie beziehen. Wie bereits aufgezeigt wurde (52,53,54), bezieht das Schwein die Energie für die Erythrozyten aus Nucleosiden. Für den Vogel liegen aus der Literatur noch keine Befunde vor.

Bekannt ist jedoch, daß aviäre Erythrozyten über Transportmechanismen zur Aufnahme von Aminosäuren verfügen (56). Es lassen sich ebenfalls Hinweise darauf finden, daß in Vogeler erythrozyten bestimmte Aminosäuren umgesetzt werden, z.B. Alanin und Glutaminsäure (87). Ob dies aber in nennenswertem Umfange erfolgt, ist fraglich. Ob und welche anderen Substanzen darüberhinaus noch als Energieträger benutzt werden, darüber liegen bis heute noch keine Hinweise vor.

1.3. Zielsetzung

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, gibt es in der Literatur keine einheitliche Meinung darüber, ob der Hühnererythrozyt Glucose verstoffwechselt. In vorliegender Arbeit wurde deshalb diese Frage eingehend studiert.

Dabei konnte ein Umsatz von Glucose in suspendierten Hühnererythrozyten aufgezeigt werden.

Ausgehend von diesem Befund wurde nun untersucht, welche Faktoren in den Glucoseumsatz eingreifen. Dabei wurde der Einfluß der Zusammensetzung des Mediums, der Glucose-transport durch die Zellmembran und der mitochondriale Energiestoffwechsel auf den Umfang des Glucoseumsatzes untersucht.

In diesem Zusammenhang interessierte auch die Bedeutung des Glucoseumsatzes hinsichtlich der zellulären ATP - Bildung.

Schließlich wurde untersucht, inwieweit auch der Pentose - Phosphat - Zyklus in Hühnererythrozyten von Bedeutung ist.

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Material und Methoden

2.1.1. Reagenzien: Die benötigten Reagenzien und die Herstellerfirmen sind im folgenden aufgeführt:

Enzyme, Coenzyme	Fa. Böhringer, Mannheim
Heparin (Liquemin ^R)	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen
Ficoll-Paque	Pharmacia Fine, Chemicals AG Uppsala, Sweden
U- ¹⁴ C-Glucose, U- ¹⁴ C-Lactat	Ammersham-Buchler, Braunschweig
alle übrigen Reagenzien	Fa. E. Merck AG, Darmstadt

Zur Herstellung der Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, aqua dest. verwendet.

2.1.2. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an embryonalen und neugeborenen Küken sowie an adulten Tieren der Weißen Leghornrasse durchgeführt. Die Eier wurden vom Versuchsgut Heinrichsruh bei München bezogen. Untersucht wurden Tiere unterschiedlicher Entwicklungsstufen, angefangen von 19 Tage alten Embryonen bis zu 5 Monate alten Tieren. Die Eier wurden im Institut bei Temperaturen von 37°C - 38°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 63% - 68% ausgebrütet. Die Haltung der geschlüpften Küken erfolgte in einer temperierten Batterie. Die erwachsenen Tiere wurden in normalen Käfigbatterien gehalten. Gefüttert wurde ein handelsübliches Alleinfuttermittel für Hühnerküken und Hühner (Bayerische Kraftfutter GmbH). Trinkwasser konnte ad libitum aufgenommen werden.

2.1.3. Blutuntersuchungen

Die Blutentnahme erfolgte bei den Embryonen und geschlüpften Küken durch Herzpunktion. Um eine ausreichende Blutmenge für die Untersuchungen bei embryonalen und frisch geschlüpften Küken zu erhalten, wurde das entnommene Blut mehrerer Küken (ca. 5) gesammelt. Die Gerinnung des Blutes wurde durch Zugabe von 100 μ l einer verdünnten Heparinlösung (Liquemin^R) pro 10 ml Blut verhindert. Aus dem gewonnenen Blut wurde die Erythrozytensuspension hergestellt.

Zu diesem Zweck wurde das Blut mit Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) im Verhältnis 1:2 verdünnt und bei 3000 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit den oberen Erythrozytenschichten mit einer Pipette abgesaugt. Der verbliebene Erythrozytenniederschlag wurde im Verhältnis 1:2 mit Krebs-Henseleit-Puffer gewaschen und erneut wie oben zentrifugiert. Der Vorgang wurde noch ein drittes Mal wiederholt. Der nun verbliebene Erythrozytenniederschlag wurde dann mit Krebs-Henseleit-Puffer auf das ursprüngliche Blutvolumen wieder aufgefüllt.

Vergleichend wurden Erythrozyten mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten isoliert. Dabei wurde in einem Zentrifugenglas eine Ficoll-Lösung mit derselben Menge an Blut, das zuvor im Verhältnis 1:2 mit Krebs-Henseleit-Puffer verdünnt worden war, überschichtet und 10 min bei 3000 x g zentrifugiert. Im weiteren wurden die Erythrozyten dann wie oben behandelt.

Unter dem Mikroskop zeigte sich, daß die Erythrozytensuspensionen nur noch vereinzelt Leukozyten enthielten. Damit war sichergestellt, daß die glykolytische Aktivität der Leukozyten die Ergebnisse nicht beeinflusst.

Die Erythrozytensuspension wurde zu je 1,0 ml zusammen mit der erforderlichen Substanzmenge in Eppendorf-Reaktionsgefäße übergeführt. Dabei wurden folgende Konzentrationen im Ansatz verwendet:

Glucose	: 10 mmolar
Guanosin	: 10 mmolar
Adenosin	: 10 mmolar
Inosin	: 10 mmolar
Adenin	: 10 mmolar
Antimycin A	: 1 mmolar
Natriumfluorid	: 1 mmolar
Methylenblau	: 1 mmolar
γ-Strophantin	: 1 mmolar
Jodacetamid	: 1 mmolar

Dieses Lösungsgemisch wurde dann sofort bei 37°C im Schüttelbad 60 min inkubiert. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte mit 50 µl einer 50% Trichloressigsäurelösung (TCE). Um Bestimmungen an Proben zum Zeitpunkt t=0 durchführen zu können, wurden bestimmte Proben sofort nach Zugabe der Substanzen mit TCE gestoppt. Der jeweils gestoppte Reaktionsansatz wurde in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Modell 3200) bei 10000 x g 2 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und im Eisbad bei 4°C aufbewahrt. Nach 10 min wurde er zur Registrierung des pH-Wertes mit 10 µl einer Methylorangelösung versetzt und mit KHCO₃ neutralisiert. Diese Lösung wurde erneut 2 min bei 10000 x g zentrifugiert, und der dabei entstehende Überstand wurde zur Bestimmung der Metaboliten verwendet.

Vom Vollblut und von der Erythrozytensuspension wurde der Hämatokrit durch Zentrifugation bei 1200 x g (8 min) über eine Schablone ermittelt:

Der Vergleich des Hämatokritwertes der Erythrozytensuspension mit dem der erwachsenen Tiere und der Embryonen zeigt, daß in der Suspension der Hämatokrit deutlich

niedriger liegt.

Tab. 1: Hämatokritwerte des Blutes und der Erythrozytensuspension

Embryonen 20. Tag	Adulte Tiere	Erythrozytensuspension
29,50	34,75	21,50
$\pm 1,60$	$\pm 1,67$	$\pm 4,64$

Anzahl der Proben: n = 8

Bestimmung der Metaboliten

a) U-¹⁴C-Glucose und U-¹⁴C-Lactat

Die Erythrozytensuspension wurde mit 100 μ l einer 8,25 μ Ci/ml enthaltenden Glucoselösung versetzt und wie oben beschrieben, inkubiert. Anschließend wurde versucht, die Glucose von evtl. gebildeten Metaboliten abzutrennen. Dabei wurde davon ausgegangen, daß das Lactat das Hauptabbauprodukt darstellt. Es wurde daher eine Auftrennung im Anionenaustauscher angestrebt. Es zeigte sich jedoch in Vorversuchen, daß diese Auftrennung nicht befriedigend war. In weiteren Versuchen wurde die Abtrennung der Glucose mit Hilfe der Elektrophorese angestrebt. Diese Experimente verliefen erfolgreich. Dabei wurde in nachfolgend beschriebener Weise vorgegangen:

Zur Abtrennung der radioaktiven Glucose von den entstandenen Metaboliten in den Erythrozyten wurde die Inkubationslösung bei 10000 x g (2 min) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und aufbewahrt. Der verbliebene Erythrozytenniederschlag wurde mit 50 μ l Krebs-Henseleit-Puffer versetzt und mit 10 μ l einer 50% TCE-Lösung denaturiert.

Nach erneuter Zentrifugation (2 min bei 10000 x g) wurde der Überstand wiederum dekantiert und aufbewahrt. Der zuerst gewonnene Überstand enthält die Metaboliten aus dem Inkubationsmedium, der zuletzt gewonnene Überstand enthält die Metaboliten der Erythrozyten. In den Versuchen (Abb. 9a-d) zeigte sich, daß in den Erythrozyten weder radioaktive Glucose noch radioaktive Metaboliten angereichert wurden. Im überwiegenden Teil der Versuche wurde daher auf eine Abtrennung der Erythrozyten vom Medium verzichtet.

Jeweils 20 μ l des Überstandes wurden auf einen Elektrophoresestreifen (2 cm breit, 15 cm lang) an einem markierten Punkt aufgetragen. Die Streifen wurden so in die Elektrophoresekammer (Dr. Bender und Dr. Hobein, München) eingelegt, daß sich die Auftragspunkte auf der Seite der Kathode der Kammer befanden. Bei Einschalten des Stromes (195 V, 162 μ A) wandern die negativ geladenen Metaboliten zur Anode, während das ungeladene Glucosemolekül an der Auftragsstelle liegenbleibt. Nach 45 min in der Kammer wurden die Streifen entnommen, getrocknet und die Lage der Peaks im Scanner (Dünnschicht-Scanner, Fa. Berthold, Wildbad) registriert. Dabei wurden folgende Bedingungen eingehalten: Spaltenbreite 4mm, Suchgeschwindigkeit 1200 mm/Std, Empfindlichkeitseinstellung 10, Trägheit 3 sec.

Weitere Versuche zeigten, daß mit einer 0,25 molaren Saccharoselösung, der pro Liter 3,0 ml einer 3 molaren HCl und 2,5 ml einer 3,5 molaren NaOH-Lösung zugegeben waren und die auf pH 9,3 eingestellt war, die Auftrennung optimiert werden konnte.

Wie aus Abbildung 2 zu ersehen ist, war eine deutliche Abtrennung eines Gemisches aus 5 μ l reiner radioaktiver Glucose und 5 μ l reines radioaktiven Lactates möglich.

Abb. 2: Die elektrophoretische Auftrennung eines
Glucose - Lactat - Gemisches

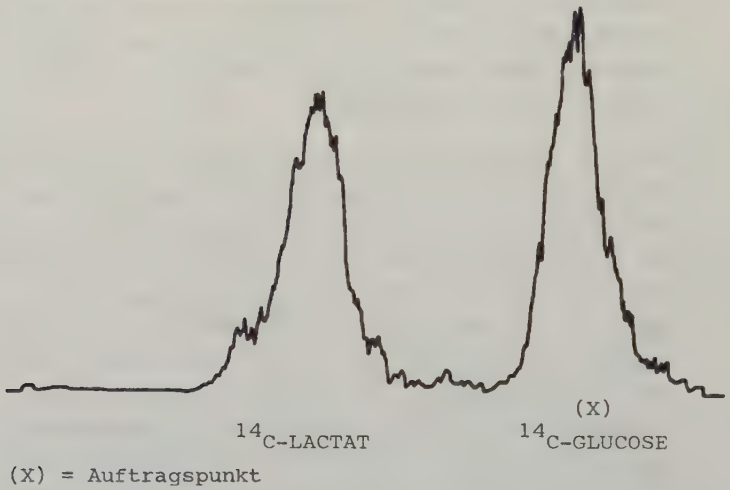
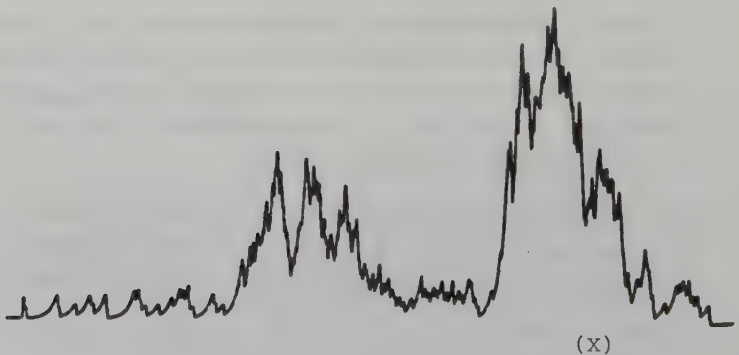


Abb. 3: Die elektrophoretische Auftrennung der Erythrozyten-
suspension nach Inkubation mit ^{14}C -Glucose



Wurden nun Überstände von Erythrozytensuspensionen, die mit radioaktiver Glucose inkubiert worden waren, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des Scanners analysiert, so bildeten sich zwei deutliche Peaks, deren erster an der Stelle der Glucose liegt und der zweite an der Stelle des Lactates (Abb. 3).

b) L-Lactat

Die L-Lactatbestimmung erfolgte nach der von HOHORST beschriebenen Methode (44).

c) 2-3-Diphosphoglycerat (2-3-DPG)

Die 2-3-DPG-Konzentration wurde enzymatisch nach KRIMSKY bestimmt (57). Bei dieser Methode wird 2-3-DPG als Kofaktor für die PGM eingesetzt. Bei niedrigen 2-3-DPG-Konzentrationen zeigt die PGM-Aktivität eine lineare Abhängigkeit von der 2-3-DPG-Konzentration. Das aus der PGM gebildete 2 PG wird in Pyruvat und anschließend in Lactat übergeführt. Die dabei gebildete NAD-Menge dient als Maß für die 2-3-DPG-Konzentration.

d) L-Malat

Die Bestimmung der L-Malat-Konzentration erfolgte enzymatisch nach HOHORST (45).

e) ATP

Die ATP-Konzentration wurde nach der von JAWOREK et al. beschriebenen Methode bestimmt (49).

f) Pyruvat und Phosphoenolpyruvat

Die Messung dieser Metaboliten erfolgte nach der Methode von CZOK und LAMPRECHT (26).

2.1.4. Statistische Berechnungen

Die Werte in den Tabellen und Abbildungen stellen Mittelwerte ($\bar{x}$) mit den entsprechenden Standardabweichungen ($\pm$) dar. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Testes berechnet (74).

2.2. Ergebnisse

2.2.1. Metabolische Untersuchungen an isolierten Erythrozyten

Am Anfang wurde untersucht, ob Hühnererythrozyten Glucose verstoffwechseln. Zu diesem Zweck wurden Erythrozyten mit und ohne Glucose versetzt, und nach 60 min Inkubation die Lactatkonzentration bestimmt. Diese wurde mit der vor der Inkubation verglichen. Wurden die Proben nicht mit Glucose versetzt, so ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Lactatkonzentration zwischen dem Zeitpunkt $t=0$ und $t=60$ min (Abb. 4).

Wurden die Erythrozyten jedoch mit Glucose inkubiert, so war ein deutlicher Anstieg der Lactatkonzentration von $0,343 \mu\text{mol/ml}$ zum Zeitpunkt $t=0$ auf $0,633 \mu\text{mol/ml}$ nach 60 min zu verzeichnen (Abb. 4).

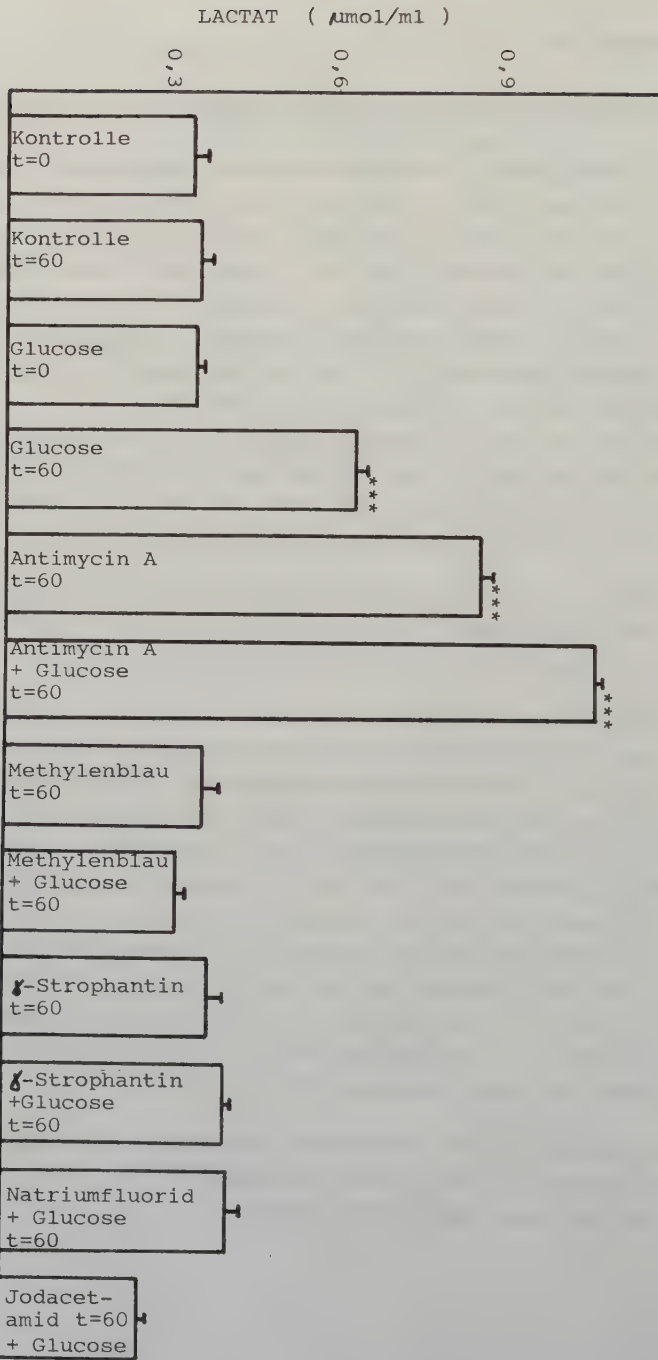
Wurden die Erythrozyten hingegen mit einem Ficoll-Gradienten abgetrennt, so war kein signifikanter Anstieg der Lactatkonzentration zu verzeichnen (Abb. 5).

Weitere Versuche sollten zeigen, ob die Art des Mediums einen Einfluß auf die Lactatbildung hat. Daher wurden neben dem Krebs-Henseleit-Puffer auch Proben mit einem $0,15$ molaren Phosphatpuffer oder mit einem $0,25$ molaren Saccharosepuffer versetzt. Dabei ergab sich bei dem Phosphatpuffer ein Anstieg der Lactatkonzentration von $0,399 \mu\text{mol/ml}$ bei $t=0$ auf $0,571 \mu\text{mol/ml}$ bei $t=60$. Bei Verwendung des Saccharosepuffers hingegen gab es nur einen geringfügigen Anstieg von $0,348 \mu\text{mol/ml}$ auf $0,460 \mu\text{mol/ml}$. Den höchsten Anstieg der Lactatkonzentration von $0,343 \mu\text{mol/ml}$ auf $0,633 \mu\text{mol/ml}$ bewirkte jedoch der Krebs-Henseleit-Puffer (Abb. 6).

Im weiteren wurde untersucht, ob der Glucoseabbau auch mit einer 2-3-DPG-Bildung einhergeht.

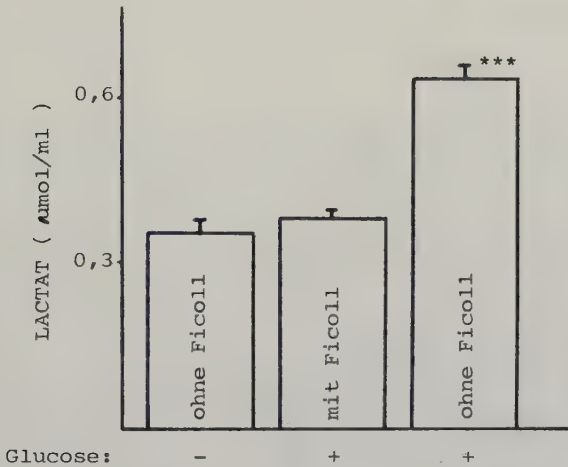
Für die Untersuchungen wurde das

Abb. 4: Die Lactatkonzentration in der Erythrozytensuspension vor (t=0) und nach der Inkubation (t=60)



Anzahl der Versuche: n = 15
 *** p < 0,001 bezogen auf die Kontrolle t=60

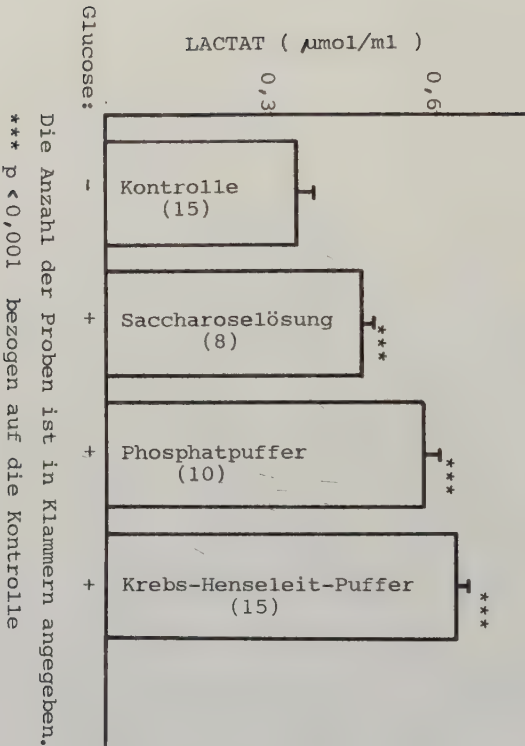
Abb. 5: Der Einfluß von Ficoll auf die Lactatbildung



Probenzahl: n = 8

*** $p < 0,001$ bezogen auf die Probe
ohne Glucose

Abb. 6: Der Einfluss des Inkubationsmediums auf die Lactatkonzentration (t=60)



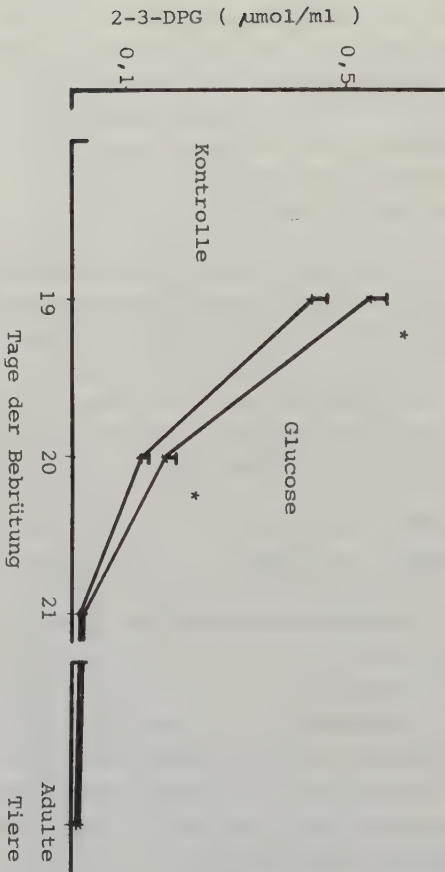
Blut von prae-, neonatalen und von adulten Tieren verwendet, da wie bereits eingangs ausgeführt, der 2-3-DPG-Spiegel gegen Ende der Embryonalentwicklung abnimmt. Die 2-3-DPG-Konzentration fällt bei den Kontrolltieren vom 19. zum 21. Tag steil ab, wobei der Zusatz von Glucose nur in der pränatalen Phase zu einer signifikanten Erhöhung der 2-3-DPG-Konzentration führte (Abb.7). Bei adulten Tieren war die 2-3-DPG-Konzentration in beiden Ansätzen nicht mehr zu messen.

In anschließenden Untersuchungen wurde die Auswirkung der Hemmung der Glykolyse auf die Lactatkonzentration untersucht. Wie aus Abbildung 4 zu ersehen, war sowohl beim Einsatz von NaF, das auf der Stufe der Enolase die Glykolyse hemmt, als auch bei der Verwendung von Jodacetamid, das die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase hemmt, kein Anstieg der Lactatkonzentration zu beobachten.

Weitere Versuche sollten zeigen, ob der in Abbildung 4 beobachtete Lactatanstieg bei Inkubation mit Glucose auch tatsächlich durch den Abbau der Glucose verursacht wird. Zu diesem Zweck wurden Erythrozyten mit radioaktiv markierter Glucose inkubiert. Es zeigte sich, daß der Glucosepeak sich mit zunehmender Inkubationsdauer verringerte (Abb. 8a-d). Gleichzeitig stieg die Konzentration radioaktiver Metaboliten im Bereich des Lactatpeaks an. Messungen der Radioaktivität der Metaboliten in den Erythrozyten zeigten aber, daß sich sowohl Glucose als auch Glucosemetaboliten in den Erythrozyten nicht oder nur gering anreichern (Abb. 9a-d).

In den Versuchen wurde auch NaF zur Hemmung der Glykolyse eingesetzt. Aus den Scannerabbildungen ist ersichtlich, daß bei Zugabe von NaF im Bereich des Lactates keine Erhöhung der Radioaktivitätskonzentration festzustellen war (Abb. 10a,b). Eine quantitative Auswertung der Glucosepeaks ergab außerdem einen verminderten Glucoseabbau bei Verwendung von NaF (Abb. 11).

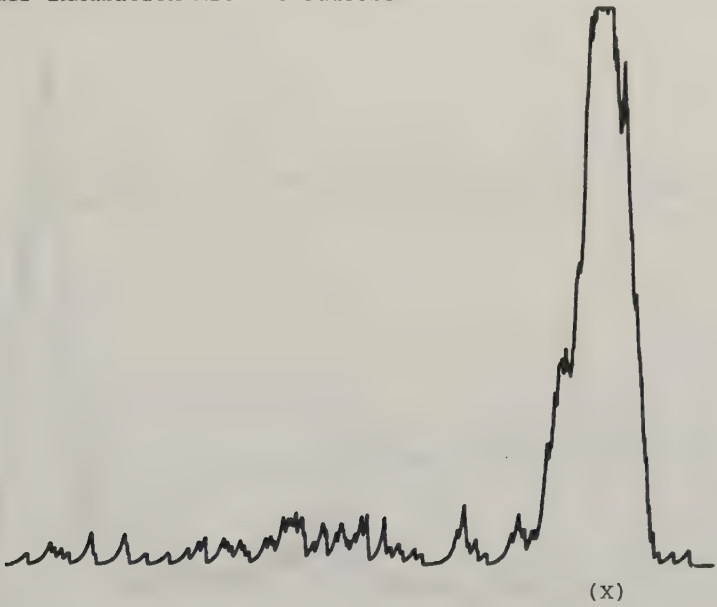
Abb. 7: Der Abfall der 2-3-DPG-Konzentration in Erythrozyten beim Übergang von der prä- zur postnatalen Phase



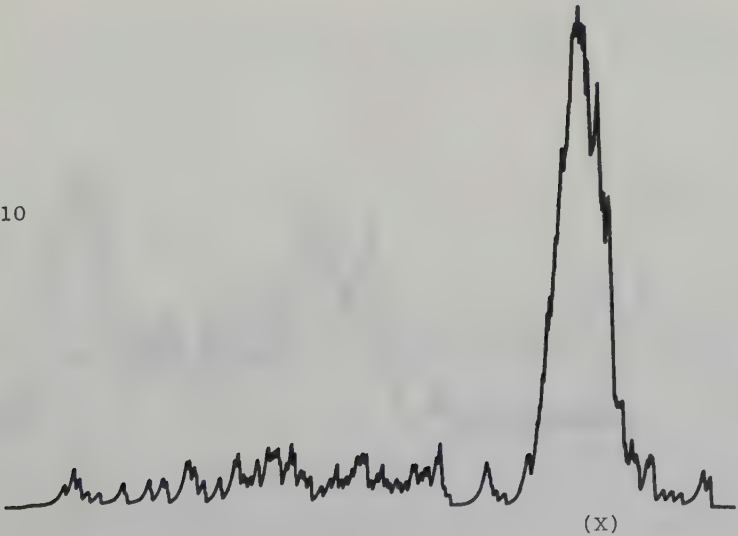
* $p < 0,05$ bezogen auf die Kontrolle
Anzahl der Versuche: $n = 6$

Abb. 8: Die Registrierung der Radioaktivität im Medium während der Inkubation mit ^{14}C -Glucose

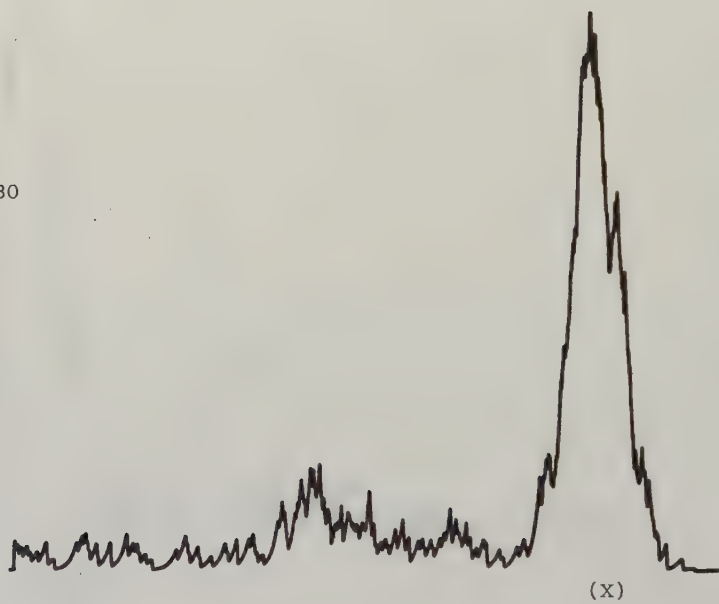
a) $t=0$



b) $t=10$



c) $t=30$



d) $t=60$

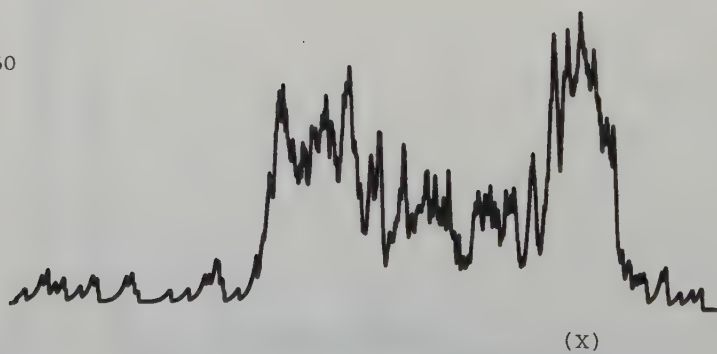
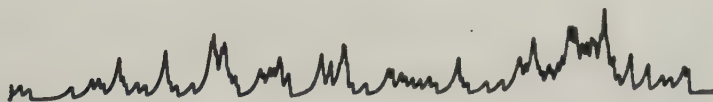
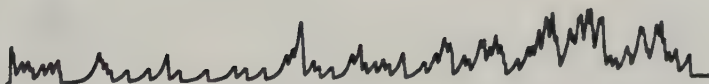


Abb. 9: Die Registrierung der radioaktiven Substanzen in den Erythrozyten während der Inkubation mit ^{14}C -Glucose

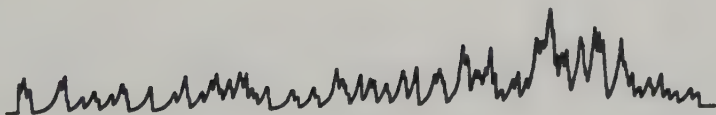
a) $t=0$



b) $t=10$



c) $t=30$

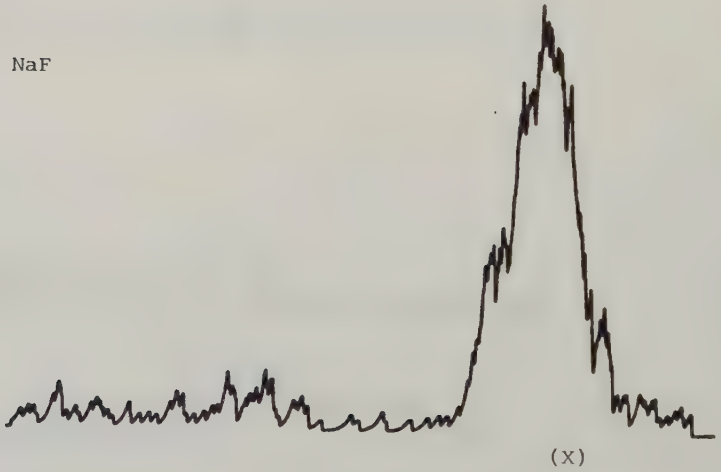


d) $t=60$



Abb. 10: Der Einfluß von Natriumfluorid auf den Umsatz von ^{14}C -Glucose

a) mit NaF



b) ohne NaF

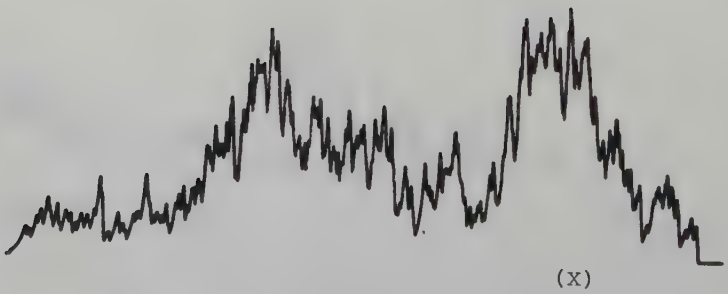
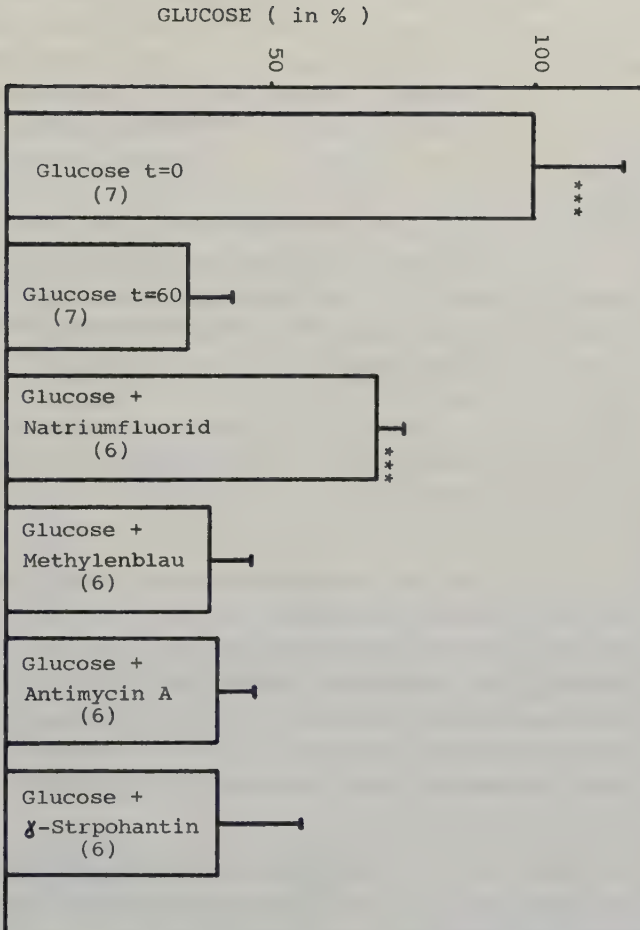


Abb. 11: Die prozentuale Abnahme der ^{14}C -markierten Glucosekonzentration während der Inkubation (t=60)
Die zum Zeitpunkt t=0 vorhandene Glucose beträgt 100%



Die Anzahl der Proben ist in Klammern angegeben.
*** $p < 0,001$ bezogen auf die Glucosekonzentration (t=60).

Im Folgenden wurde untersucht, ob Eingriffe in den mitochondrialen Energiestoffwechsel Auswirkungen auf die Glykolyse zur Folge haben. Zu diesem Zweck wurde die mitochondriale ATP-Bildung durch Antimycin A, das die oxidative Phosphorylierung hemmt, bzw. durch Methylenblau, das die verfügbare Konzentration von Reduktionsäquivalenten verringert, gehemmt. Schließlich wurde durch Zugabe von γ -Strophantin auch noch die Na-K-ATPase blockiert.

Die Zugabe von Antimycin A bzw. von Methylenblau zum Ansatz führte zu einem drastischen Abfall der ATP-Konzentration (Abb. 12). Die Zugabe von Glucose zu den mit Antimycin A oder Methylenblau versetzten Erythrozyten bewirkte keinen Anstieg der abgesunkenen ATP-Konzentration (Abb. 12).

Im Falle von γ -Strophantin, das zusammen mit Glucose den Erythrozyten beigegeben wurde, entsprach die ATP-Konzentration annähernd der Konzentration der Kontrolle (Abb. 12).

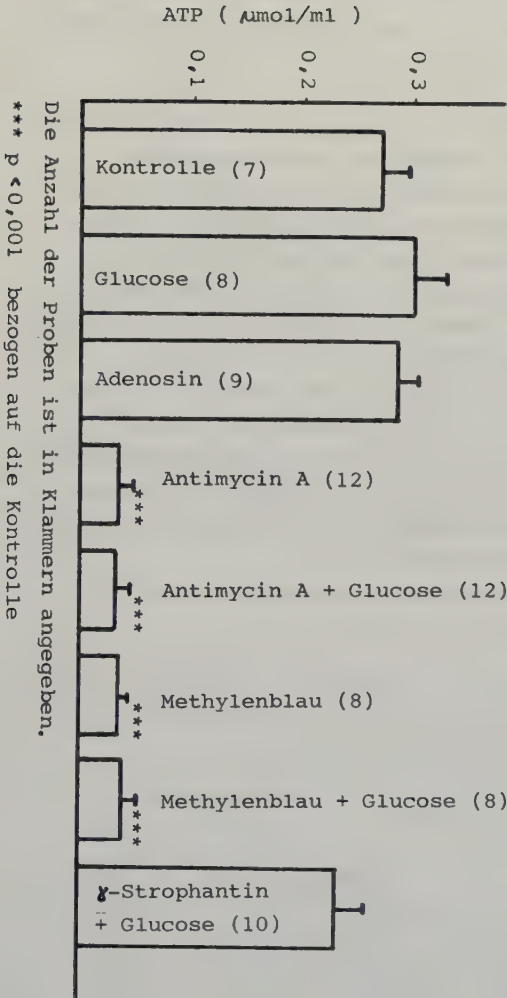
Die Zugabe von Antimycin A führte zu einem deutlichen Anstieg der Lactatkonzentration, die in Anwesenheit von Glucose noch weiter gesteigert wurde (Abb. 4).

Im Gegensatz dazu blieb beim Einsatz von Methylenblau die Lactatkonzentration annähernd konstant (Abb. 4). Außerdem zeigt diese Abbildung, daß durch Methylenblau der durch Glucose bewirkte Anstieg der Lactatkonzentration unterdrückt wird.

Ein ähnlicher Befund ergab sich auch bei Verwendung von γ -Strophantin. Auch hier wurde der von der Glucose bewirkte Lactatanstieg unterdrückt (Abb. 4). Der ATP-Spiegel verschob sich bei Verwendung des γ -Strophantins nur leicht nach unten (Abb. 12).

Ergänzend interessierte der Einfluß des Methylenblaus auf die Pyruvatkonzentration. Wie Abbildung 13 zeigt, führte die Zugabe von Glucose zu einem Pyruvatanstieg, der durch Zusatz von Methylenblau nochmals gesteigert werden konnte.

Abb. 12: Die ATP-Konzentration in der Erythrozytensuspension nach 60 Minuten Inkubation



Die Eingriffe in den Energiestoffwechsel durch Antimycin A, Methylenblau oder γ -Strophantin führten zu keiner Beeinflussung des Glucoseabbaues. Dies ist aus Abbildung 11 zu ersehen.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, daß die Erythrozyten des Schweines Nucleoside verstoffwechseln. In abschließenden Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit dies auch für die Erythrozyten des Huhnes gilt. Dabei zeigte sich, daß bei Zugabe von Guanodin, Inosin und Adenosin die Lactatkonzentration deutlich ansteigt (Abb. 14). Wurde ein Purinderivat ohne Ribose-rest (Adenin) eingesetzt, so erhöhte sich der Lactat Spiegel nicht (Abb 14). Inosin und Adenosin aber nicht Adenin erhöhten die Pyruvatkonzentration (Abb. 15). Ein ähnlicher Befund ergab sich auch beim Phosphoenolpyruvat. Dessen Konzentration wurde ebenfalls durch Inosin und Adenosin und nicht durch den ribosefreien Rest (Adenin) erhöht (Abb. 16). Die Zugabe von Adenosin hatte keine Auswirkung auf die ATP-Konzentration (Abb. 12).

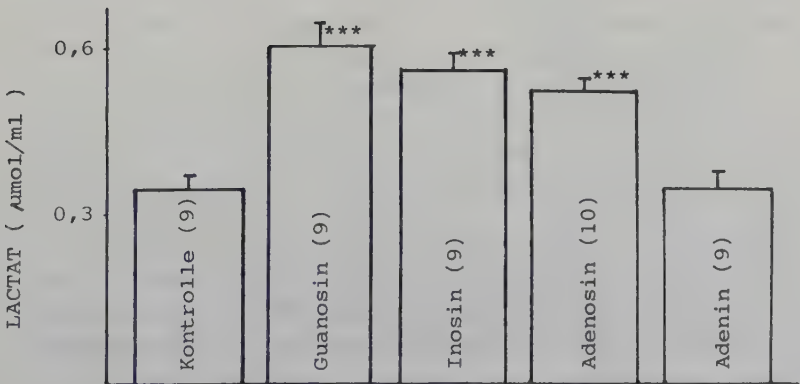
Abb. 13: Die Pyruvatkonzentration in der Erythrozytensuspension nach 60 Minuten Inkubation



Die Anzahl der Proben ist in Klammern angegeben.

*** $p < 0,001$ bezogen auf die Kontrolle

Abb. 14: Der Einfluß von Guanotin, Inosin, Adenosin und Adenin auf die Lactatkonzentration ($t=60$)



Die Anzahl der Proben ist in Klammern angegeben.

*** $p < 0,001$ bezogen auf die Kontrolle

Abb. 15: Der Einfluß von Inosin, Adenosin und Adenin auf die Pyruvatkonzentration (t=60)

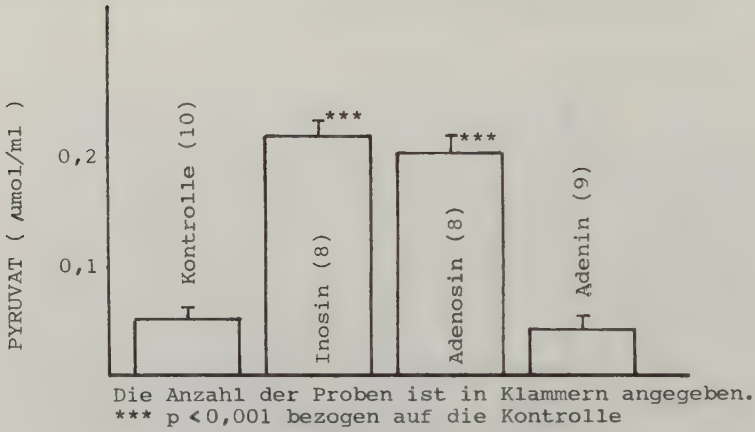
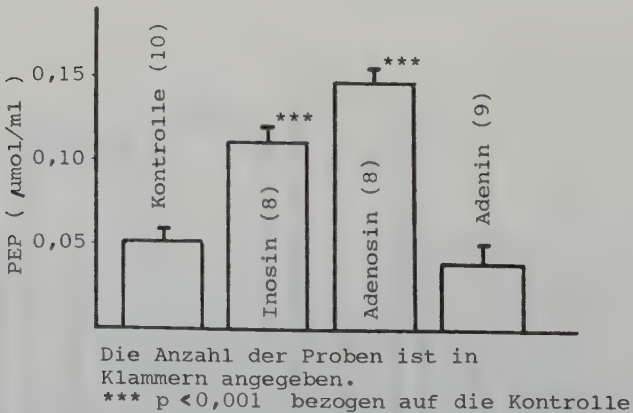


Abb. 16: Die Phosphoenolpyruvatkonzentration (PEP) in der Erythrozytensuspension nach 60 Minuten Inkubation



3. Diskussion

Ausgangspunkt der Arbeit war die Frage, ob Vogelerythrozyten Glucose verstoffwechseln. Diese Frage konnte insoweit geklärt werden, als Erythrozyten des Huhnes aus der angebotenen Glucose Lactat bildeten. Diese Lactatbildung konnte durch Stoffe, die die Glykolyse hemmen wie z.B. NaF oder Jodacetamid, verhindert werden.

Deutlich waren Hinweise auf einen Glucoseabbau beim Einsatz ^{14}C -markierter Glucose: Im Verlauf der Inkubation wurde eine Abnahme der Glucosekonzentration festgestellt, und gleichzeitig war eine Zunahme radioaktiver Substanzen zu beobachten, die sich bei der elektrophoretischen Auftrennung im Bereich des Lactates befanden (Abb. 3). Es wurden keine Untersuchungen zur weiteren Identifizierung dieser Peaks im Bereich des Lactates durchgeführt, da sich die einzelnen Peaks nicht deutlich voneinander absetzten. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß es sich hierbei vorwiegend um Lactat handelt, da sich dieser Metabolit beim Glucoseabbau am stärksten anreichert.

Da aviäre Erythrozyten über die enzymatische Ausstattung für die Glykolyse verfügen (62), überrascht der Befund, daß sie Glucose verstoffwechseln, nicht. Es bleibt jedoch unklar, warum diese glykolytische Aktivität von anderen Autoren (11,16,68,83,) nicht aufgezeigt werden konnte. Möglicherweise ist das z.T. darauf zurückzuführen, daß in früheren Arbeiten die Untersuchungen erst nach längerer Lagerung der Erythrozyten durchgeführt wurden. Dadurch wurde möglicherweise der Transport beeinträchtigt, wie das bei längerer Lagerung von Humanerythrozyten für den Glucosetransport der Fall ist (48).

Die Höhe des Glucoseumsatzes ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Nach Isolierung der Erythrozyten mit Ficoll konnte nur ein sehr geringer Glucoseumsatz festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit den Unter-

suchungen von KLINGER (55), der ebenfalls nur eine minimale glykolytische Aktivität bei mit Ficoll isolierten Erythrozyten beobachtet hatte. Außerdem ist die Art des Inkubationsmediums von großer Bedeutung. Bei Verwendung einer Saccharoselösung betrug der Glucoseumsatz nur ca. 38%, bei Verwendung eines Phosphatpuffers dagegen ca. 78%, bezogen auf den Krebs-Henseleit-Puffer. Offensichtlich hängt der Glucoseumsatz von der Anwesenheit der Phosphationen ab. Diese Abhängigkeit wurde auch bei anderen Spezies aufgezeigt (6,30,31,33,43,62,80). In diesem Zusammenhang sind auch Befunde interessant, wonach eine Verbindung zwischen dem Phosphattransport und der Glykolyse besteht. Ist die Phosphatkonzentration in den Erythrozyten hoch, so ist auch die Glykolyseaktivität hoch (48). Umgekehrt lies sich zeigen, daß NaF in den Erythrozyten nicht nur die Glykolyse, sondern auch den Phosphattransport hemmt (39,90). Außerdem konnte gezeigt werden, daß bei der Hemmung des Phosphattransportes durch γ -Strophantin auch die Lactatbildung behindert ist (Abb. 4).

Wie in der Einleitung ausgeführt, dient die Glykolyse in den Säuger-Erythrozyten auch zur 2-3-DPG-Bildung. (35,36). Die Experimente dieser Arbeit ergaben keinen Hinweis auf eine 2-3-DPG-Bildung über die Glykolyse bei Hühnererythrozyten. Es konnte aber festgestellt werden, daß nur in der pränatalen Phase eine Steigerung von 2-3-DPG bei ablaufender Glykolyse möglich war (Abb. 7). Beim Übergang von der prä- zur neonatalen Phase sinkt die 2-3-DPG-Konzentration gegen Null. Dieser 2-3-DPG Abfall darf nicht mit einer Verringerung der Glykolyse in Verbindung gebracht werden, sondern hängt offensichtlich mit dem Verschwinden der Diphosphoglyceratmutase zusammen, die die Bildung von 2-3-DPG aus 1-3-DPG katalysiert. Dieses Enzym weist nach dem Schlupf eine kaum noch meßbare Aktivität auf (5). Es sei jedoch bemerkt, daß auch andere Autoren in den Erythrozyten erwachsener Vögel kein 2-3-DPG fanden (35,42,55).

Bei den vorliegenden Versuchen wurde in den isolierten Erythrozyten nur eine sehr geringe Glucosekonzentration festgestellt. Bei Verwendung radioaktiv markierter Glucose wurde dieser Befund erhärtet. Gleichzeitig wurde festgestellt, daß sich Glucose auch während der Inkubation in den Erythrozyten nicht anreichert. Offensichtlich wird die von den Erythrozyten aufgenommene Glucose gleich wieder umgesetzt. Dies deutet darauf hin, daß der Transport der limitierende Faktor ist.

Dies steht in Einklang mit anderen Arbeiten, wonach der Transport auch in anderen aviären Erythrozyten den limitierenden Faktor für den Glucoseumsatz darstellt (15,56,65,96,97,98,99,101).

In der Literatur herrscht die Meinung vor, daß die Mitochondrien der Vogelerythrozyten, wegen ihres geringen Sauerstoffverbrauches im Vergleich zu anderen mitochondrienhaltigen Zellen, und auch deren Kern keine besondere Funktion besitzen (14,87). Allerdings sprechen die Enzymausstattung und die Metaboliten für eine gewisse mitochondriale Aktivität (27,29,83).

Eigene Versuche zeigten, daß die Glykolyse nicht nennenswert zur zellulären ATP-Konzentration beiträgt. Bei der Zugabe von Glucose kam es nur zu einer leichten ATP-Steigerung, die sich aber statistisch nicht absichern lies (Abb. 12). Wurde außerdem die mitochondriale Tätigkeit durch die Zugabe von Antimycin A gehemmt, so fiel die ATP-Konzentration in den Erythrozyten drastisch ab (Abb. 12). Gleichzeitig erhöhte sich die Lactatkonzentration von 348 nmol/ml auf 855 nmol/ml (Abb. 4). Geht man davon aus, daß dies ausschließlich durch die Hemmung der Mitochondrien zustande gekommen ist, so muß man annehmen, daß pro ml Erythrozytensuspension ca. 500 nmol C-3-Körper pro 60 Minuten in den Mitochondrien umgesetzt wurden.

Ein ähnlicher Effekt wie mit Antimycin A konnte auch mit Methylenblau erzielt werden. Bei dessen Anwesenheit

erniedrigte sich die ATP-Konzentration ebenfalls drastisch (Abb. 12). Der Lactätspiegel wurde dabei aber nicht erhöht. Der Einfluß von Methylenblau auf den ATP-Abfall kommt dadurch zustande, daß die oxidierende Aktivität des Methylenblau die Reduktionsäquivalente (NADH) bindet. Dadurch entfällt einmal das Substrat für die oxidative Phosphorylierung und zum anderen der Wasserstoff, der zur Bildung von Lactat aus Pyruvat benötigt wird (Abb. 1).

Die Tatsache, daß in Anwesenheit von Antimycin A eine Zugabe von Glucose nicht zu einem ATP-Anstieg führte, zeigt, daß der Glykolyse keine nennenswerte Bedeutung bei der ATP-Bildung zukommt. Offensichtlich wird das zelluläre ATP maßgeblich von den Mitochondrien gebildet. Andererseits zeigten die Untersuchungen aber auch, daß eine Blockierung der mitochondrialen Aktivität zu keinem gesteigerten Glucoseabbau führte. Dies kann aus Abbildung 11 entnommen werden. Offensichtlich ist der von anderen mitochondrienhaltigen Zellen her bekannte Pasteureffekt bei den Erythrozyten des Vogels nicht wirksam. Die Ursache hierfür dürfte darin zu sehen sein, daß, wie bereits oben beschrieben, der Glucosetransport und nicht der Abbau der Glucose, der für den Pasteureffekt entscheidend ist, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

Überraschend waren die Befunde beim Einsatz von γ -Strophantin, das bekanntlich die Na-K-ATPase hemmt. Es verhinderte ein Ansteigen der Lactatkonzentration (Abb. 4) ohne daß gleichzeitig der Glucoseumsatz gehemmt wurde (Abb. 11). Die Frage, warum das Lactat nicht angestiegen ist, konnte nicht geklärt werden und bleibt anderen Versuchen vorbehalten.

Weitere Versuche beschäftigten sich mit dem Abbau von Purinen im Hühnererythrozyten.

Beim Einsatz von Nukleosiden kam es zu einem Anstieg der Lactat- und Pyruvatkonzentrationen (Abb. 14, 15).

Dies konnte bei Zugabe von Adenin nicht beobachtet werden. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die Hühnererythrozyten den Riboseanteil der Nucleoside über den Pentose-Phosphat-Zyklus verstoffwechseln haben. Damit kommt Ribose als metabolisierbares Substrat in Frage. Die Überführung von Adenosin in Adenin unter Abspaltung des Riboserestes wird von der Purin-Nucleosid-Phosphorylase katalysiert. Diesem Schritt wurde in den Organen keine große Bedeutung beigemessen (3). Demgegenüber scheint er jedoch in den Erythrozyten erwachsener Schweine wichtig zu sein, da die Erythrozyten des Schweines wie bereits aufgezeigt wurde (51,52,53,54) ihre Energie über den Abbau von Nucleosiden gewinnen.

Vergleicht man die Veränderungen der Lactat- und Pyruvatkonzentrationen unter dem Einfluß von Nucleosiden mit denen, die beim Einsatz von Glucose entstehen, so stellt man bei beiden eine deutliche Erhöhung der Konzentrationen dieser Metaboliten fest (Abb. 4,13,14,15).

Es fällt aber auf, daß bei Zugabe von Glucose sich der Lactat-Pyruvat-Quotient, der als wichtiger Parameter hinsichtlich des cytoplasmatischen Redoxpotentials gilt, sich nicht nennenswert verändert. Den Werten aus Abbildung 4 und 13 zu Folge sinkt er von 6,96 auf 6,33 ab. Beim Einsatz von Purinderivaten kommt es hingegen zu einem deutlichen Abfall, und zwar bei Inosin von 6,96 auf 2,57, und bei Adenosin von 6,96 auf 2,61 (Abb. 14,15). In diesem unterschiedlichen Quotienten kommt zum Ausdruck, daß die Ribose im Gegensatz zur Glucose die höher oxidierte Form darstellt.

Insgesamt zeigt sich in dieser Arbeit, daß aviäre Erythrozyten Kohlenhydrate über die Glykolyse und den Pentose-Phosphat-Zyklus abbauen. Hinsichtlich der ATP-Bereitstellung scheint der Kohlehydratabbau im Vergleich zum mitochondrialen Stoffwechsel nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Glucosestoffwechsel des Hühnererythrozyten untersucht.

In diesem Zusammenhang interessierte, inwieweit die Zusammensetzung des Mediums, der Glucosetransport durch die Zellmembran und der mitochondriale Energiestoffwechsel Einfluß auf den Umfang des Glucoseumsatzes haben.

Der Glucoseumsatz wurde einmal über die Lactatbildung aus Glucose und zum anderen über den Verbrauch radioaktiv markierter Glucose bestimmt.

Im Gegensatz zu anderslautenden Meinungen aus der Literatur bauen Hühnererythrozyten Glucose ab. Das Ausmaß des Glucoseabbaues wird offensichtlich durch den Glucosetransport durch die Erythrozytenmembran limitiert.

Außerdem ist der Umfang des Glucoseabbaues von der Art des Inkubationsmediums abhängig.

Eine Hemmung des mitochondrialen Energiestoffwechsels führt nicht zu einer Steigerung des Glucoseumsatzes. Außerdem kann der dadurch verursachte Abfall des ATP-Spiegels über die Glykolyse nicht kompensiert werden.

Ähnlich wie Glucose kann in Hühnererythrozyten auch der Riboserest aus Nucleosiden zu Pyruvat und Lactat umgesetzt werden.

S U M M A R Y

On the glucose- and mitochondrial energy metabolism of chicken erythrocytes

In the work presented here, the glucose metabolism of chicken erythrocytes was investigated.

In this connection the influence of the incubation medium, the glucose transport through the cell-membrane and the mitochondrial energy metabolism were of interest. The measurement of glucose turnover based on the lactate formation in the presence of glucose and on the consumption of labeled glucose.

In contrast to other reports, chicken erythrocytes are able to metabolize glucose. Obviously, glucose turnover is limited by the glucose transport through the cell-membrane.

In addition, the amount of glucose, metabolized in erythrocytes, depends on the composition of the incubation medium.

Inhibition of mitochondrial energy metabolism did not lead to an increase of the glucose turnover.

Furthermore the decrease of ATP as released by inhibition of the mitochondrial metabolism, can't be compensated by the glycolysis.

Similar to glucose, in chicken erythrocytes, ribose from nucleosides is metabolized to pyruvate and lactate.

5. Literaturverzeichnis

1. Ackermann N. R., 1970
The physiological effects of hypoxia on the erythrocytes of the chick embryo.
Developmental Biology 23, 310 - 323
2. Albrecht V., Roigas H., Schultze M., Jacobasch G. and Rapoport S., 1971
The influence of pH and methylene blue on the pathways of glucose utilization and lactate formation in erythrocyte of man.
Eur. J. Biochem. 20, 44 - 50
3. Arch J. R. S., Newsholme E. A., 1978
The control of the metabolism and the hormonal role of Adenosine. In: Essays in Biochemistry, Campbell P.N. and Aldrige W.N. (eds.), Vol 14, 82 - 123
4. Barron E. S. G., Harrop G. A., 1928
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201
5. Bartlett G. R., 1978
Phosphate compounds in reptilian and avian red blood cells; development changes.
Comp. Biochem. Physiol. 61 A, 191 - 202
6. Bartlett G. R., Borgese T. A., 1976
Phosphate compounds in red cells of the chicken and duck embryo and hatchling.
Comp. Biochem. Physiol. 55 A, 207 - 210
7. Baumann R., Bauer C., Bartels H., 1971
Influence of chronic and acute hypoxia on oxygen affinity and red cell 2,3 diphosphoglycerate of rats and guinea pigs.
Respir. Physiol. 11, 135 - 144
8. Becker C., Beaudreau G. S., Beard J. W., 1959
Glucose and lactate utilization by myeloblasts and erythroblasts of avian viral leukemias.
J. natn. Cancer Inst. 23, 261 - 275

9. Bell D. J., 1971a
Metabolism of the erythrocytes; In: Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, Bell D.J and Freeman B.M. (eds.),
Academic Press New York, 863 - 872
10. Bell D. J., 1971b
In: Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl,
Bell D.J. and Freeman B.M. (eds.),
Academic Press New York, 913 - 920
11. Bell D. J., Culbert J., 1968
Plasmalactate in the hen - problems of its origin.
Comp. Biochem. Physiol. 25, 627 - 637
12. Bendella A. de, 1940
Über die Verteilung des Blutzuckers zwischen Plasma
und Blutkörperchen beim Huhn.
Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Wien
13. Benesch R. E., Benesch R., 1974
The mechanism of interaction of red cell organic
phosphates with hemoglobin.
Adv. Prot. Chem. 28, 211 - 237
14. Besch E. L., 1966
Respiratory activity of avian blood cells.
J. Cell. Physiol. 67, 301 - 306
15. Beutler E., Srivastava S. V., 1968
In: Metabolism and membrane permeability of erythrocytes
and thrombocytes, Deutsch E., Gerlach K. and Moser K. (eds.),
Thieme-Verlag Stuttgart, 91 - 95
16. Bornstein A., Ascher O., 1926
Über Glykolyse im Volgelblut unter dem Einfluß
oxidationshemmender Gifte.
Z. ges. exp. Med. 52, 607 - 614

17. Brain M. C., Card R. T., 1972
In: Hemoglobin and red cell structure and function,
Brewer G.J. (ed.),
Plenum, New York, 141 - 154
18. Brewer G. J., 1972b
In: Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid
base status, Rorth M. and Astrup P. (eds.), Alfred Benzon
Symo. IV, Academic Press New York, 609 - 610
19. Brewer G. J., Eaton J. W., Weil J. V., Grover R. F., 1970
In: Red cell metabolism and function, Brewer G.J. (ed.),
Plenum New York, 95 - 114
20. Brewer G. J., Oelschlegel F. J. jr., Schoomaker F. B.,
Knutsen C. A., 1972b
In: Red cell metabolism and function, Brewer G.J. (ed.),
Plenum New York, 99 - 119
21. Brewer G. J., Noble N. A., Gilma J. G., Crens V. L.,
Kruckenberg V. C., 1978
In: The red cell, Brewer G.J. (ed.), Alan R. Liss, Inc.,
New York, 339 - 357
22. Calesnick B., Altarelli V. R., Spirtes M. A., 1960
Decrease in aerobic glycolysis following the con-
tinuous administration of L-triiodothyronine.
Endocrinology 66, 517 - 521
23. Cameron I. L., Kustberg M. L., 1969
DNA, RNA and protein synthesis during cytodifferen-
tiation of two types of chick cells.
Cytobios 1, 229 - 238
24. Cameron I. L., Prescott D. M., 1963
RNA and protein metabolism in the maturation of the
nucleated chicken erythrocyte.
Exp. Cell. Res. 30, 609 - 612

25. Crevasse L., Hewson G., Hazouri G., Shipp J., 1965
Glucose metabolism of red blood cells: study of tri-iodothyronine on red cell metabolism.
J. Lab. Clin. Med. 65, 539 - 544
26. Czok R., Lamprecht W., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, H.U. Bergmeyer (ed.),
Verlag Chemie, Weinheim, 1406 - 1408
27. Dajani R. M., Orten J. M., 1958
A study of the citric acid cycle in erythrocytes.
J. Biol. Chem. 231, 913 - 924
28. D'Amelio V., Constantino - Ceccarini E., 1969
Amino acid uptake, protein synthesis and polyribosome
profiles in maturing erythroid cells from chick embryos.
Exp. Cell. Res. 56, 1 - 9
29. Denstedt O. F., 1953
In: Blood cells and plasma proteins, Tullis J.L. (ed.),
Academic Press New York 223
30. Dische Z., 1941
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in
nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201
31. Dische Z., 1946
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in
nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201
32. Dische Z., 1951
In: Phosphorous metabolism, McElroy D.W., Glass B. (eds.),
Johns Hopkins Press, Baltimore Maryland, Vol 1, 171

33. Dische Z., Ashwell G., 1955
Zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in
nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201
34. Duhm J., 1972
The effect of 2,3-DPG and other organic phosphates on the
Donnan equilibrium and oxygen affinity of human blood.
In: Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid
base status, Rorth M., Astrup P. (eds.),
Alfred Benzon Symp. IV, Acad. Press New York, 583 - 598
35. Eaton J. W., Brewer G. J., 1968
The relationship between red cell 2,3 diphosphoglycerate
and levels of hemoglobin in the human.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 61, 756 - 760
36. Eaton J. W., Brewer G. J., Schultz J. S., Sing C. F., 1970
In: Red cell metabolism and function, Brewer G.J. (ed.),
Plenum New York, 21 - 38
37. Eldjarn L., Bremer J., 1962
Influence of the redox state of glutathion upon
pyruvate kinase in the intact erythrocyte.
Biochem. J. 84, 286 - 291
38. Gerlach E., Fleckenstein A., Freundt K. J., 1956
Konzentration und Turnover der Adenosin- und
Guanosinphosphate.
Pflügers Archiv 263, 682 - 703
39. Gourley D. R. H., 1957
Phosphate transfer in chicken erythrocytes.
Am. J. Physiol. 190 (3), 536 - 542

40. Greenwald J., 1925
A new type of phosphoric acid compound isolated from blood with some remarks on the effect of substitution on the rotation of L-glyceric acid.
J. Biol. Chem. 63, 339 - 349

41. Guest G. M., Mackler B., Graubarth H., Ammentrop P. A., 1953
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201

42. Harkness D. R., Isaacks R. E., Roth S. C., 1977
Purification and properties of 2,3-DPG-phosphatase-mutase from erythrocytes of day old chicks.
Eur. J. Biochem. 78, 343 - 351

43. Heinsen A. J., 1948
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201

44. Hohorst H. J., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, H.U. Bergmeyer (ed.), Verlag Chemie, Weinheim, 1424 - 1427

45. Hohorst H. J., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, H.U. Bergmeyer (ed.), Verlag Chemie, Weinheim, 1543 - 1547

46. Ingberman R. L., Bissonnette J. M., Hall R. E., 1984
Sugar uptake by red blood cells. In: Comparative Physiology and Biochemistry, Liège, Belgium, 27 - 31 August 1984, A 18

47. Isaacks R. E., Harkness D. R., Froeman G. A., Goldman I. H.,
Adler J. L., Sussmann S. A., Roth S., 1976b
Studies on avian erythrocyte metabolism. II. Relationship
between the major phosphorylated metabolic intermedi-
ates on oxygen affinity of whole blood in chick embryos
and chicks.
Comp. Biochem. Physiol. 53 A, 151 - 156

48. Jacquez J. A., 1983
Modulation of glucose transport in human red blood cells
by ATP.
Biochim. et Biophys. Acta 727, 367 - 378

49. Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H. U., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, H.U.Bergmeyer (ed.),
Verlag Chemie, Weinheim, 471 - 472

50. Jelkmann W., Bauer C., 1978
High pyruvate kinase causes low concentration of
2,3 diphosphoglycerate in fetal rabbit red cells.
Eur. J. Physiol. 375, 189 - 195

51. Kim H. D., 1984
ATP metabolism in mammalian red blood cells.
In: Comparative Physiology and Biochemistry,
Liege, Belgium, 27 - 31 August 1984, A 19

52. Kim H. D., Duhm J., 1974
Postnatal decrease in the oxygen affinity of pig blood
induced by red cell 2,3-DPG.
Am. J. of Physiol. Vol 226 No 4, 1001 - 1006

53. Kim H. D., McManus T. J., 1971
Studies on the energ metabolism of pig red cells.
I. The limiting role of membrane permeability
in glykolysis.
Biochim. et Biophys. Acta 230, 1 - 11

54. Kim H. D., McManus T. J., 1971
Studies on the energy metabolism of pig red cells.
II. Lactate formation from free ribose and
desoxyribose with maintenance of ATP.
Biochim. et Biophys. Acta 230, 12 - 19

55. Klinger D., 1983
Über den Glucosestoffwechsel des Hühnererythrozyten
in der prä- und neonatalen Phase.
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität
München 1983

56. Kregenow F. M., 1977
In: Membrane transport in red cells, Ellory J.C.,
Lew V.L. (eds.),
Acad. Press London, New York, San Francisco, 383 - 426

57. Krimsky L., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse,
H. U. Bergmeyer (ed.),
Verlag Chemie, Weinheim, 1396 - 1399

58. Mandeles S., Bloch K., 1955
zitiert nach Eaton J.W., Brewer G.J.; Pentose
phosphat metabolism.
Plenum New York, 435 - 471

59. Manwell R. D., Feigelson P., 1949
Glycolysis in Plasmodium Gallinaceum.
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 70, 578 - 582

60. Marinello E., 1958
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism
in nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201

61. Masing E., 1912
zitiert nach Kregenow F.M.; In: Membrane transport
in red cells,
Ellory J.C., Lew V.L. (eds.),
Acad. Press London, New York, San Francisco,
383 - 426

62. Meyerhof O., 1932
zitiert nach Kregenow F.M.; In: Membrane transport
in red cells,
Ellory J.C., Lew V.L. (eds.),
Acad. Press, London, New York, San Francisco,
383 - 426

63. Minakami S., 1969
Effect of oxygen tension on glycolysis in
erythrocytes.
Försvars-medicin 5, 181 - 186

64. Minakami S., Yoshikawa H., 1966
Studies on erythrocyte glycolysis.
J. Biochem. 139 - 144

65. Mond R., 1930
zitiert nach Kregenow F.M.; In: Membrane transport
in red cells,
Ellory J.C., Lew V.L. (eds.),
Acad. Press, London, New York, San Francisco,
383 - 426

66. Moore L. G., Brewer G. L., Oelshlegel F. J., 1972
In: Hemoglobin and red cell structure and function,
Brewer G.J. (ed.),
Plenum New York, 397 - 413
67. Morgan H. E., Whitfield C. F., 1973
Metabolic and hormone regulation of sugar transport
in eukaryotic cells.
In: Current topics in membranes and transport,
Bronner F., Kleinzeller A. (eds.),
Acad. Press New York Vol 4, 255 - 303
68. Morgan H. E., Chichester D. F., 1935
Properties of blood of the domestic fowl.
J. Biol. Chem. 110, 285 - 297
69. Murphy J. R., 1960a
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in
nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201
70. Murphy J. R., 1960b
Erythrocyte metabolism II. Glucose metabolism and
pathways.
J. Lab. Clin. Med. 55, 286 - 302
71. Negelein E., 1925
zitiert nach Kregenow F.M.; In: Membrane transport in
red cells, Ellory J.C., Lew V.L. (eds.),
Acad. Press London, New York, San Francisco, 383 - 426
72. Perutz M. F., Pulsinelli P. D., Canney H. M., 1972
In: Hemoglobin and red cell structure and function,
Brewer G. J. (ed.),
Plenum New York, 3 - 18

73. Peterson A. J., Poluhwich J. J., 1976
The effects of organic phosphates on the oxygenation
behaviour of eel multiple hemoglobins.
Comp. Biochem. Physiol. 55 A, 351 - 354

74. Pfanzagl J., 1974
Allgemeine Methodenlehre der Statistik I + II
Walter de Gruyter Verlag Berlin, New York

75. Rapoport S., 1968
The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes.
In: Essays in biochemistry, Campbell P.N., Greville G.D.
(eds.),
Acad. Press New York, Vol 4, 69 - 103

76. Rapoport S., 1969
Regulation of concentration of DPG and ATP in red
blood cells.
Försvars-medicin 5, 168 - 174

77. Rapoport S., Guest G. M., 1941
Distribution of acid - soluble phosphorous in
the blood cells of various vertebrates.
J. Biol. Chem. 138, 269 - 282

78. Rapoport S., Luebering J., 1952
An optical study of diphosphoglyceratmutase.
J. Biol. Chem. 196, 583 - 588

79. Rapoport S., Nieradt C., 1955
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in
nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201

80. Roche A. Roche J., 1929
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in
nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201

81. Rose Z. B., 1970
Enzymes controlling 2,3 diphosphoglycerate in human erythrocytes.
Fed. Proc. 29, 1105 - 1111
82. Rose Z. B., 1970
Control of red cell glycolysis.
J. Biol. Chem. 245, 4009 - 4015
83. Rubinstein D., Denstedt O. F., 1953
The metabolism of erythrocyte, III. The tricarboxylic acid cycle in avian erythrocyte.
J. Biol. Chem. 204, 623 - 637
84. Rüter E., 1923
Über Glykolyse und Milchsäurebildung im Vogelblut.
Z. ges. exp. Med. 37, 151 - 153
85. Sakhatskaya T. S., 1941
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201
86. Scherrer K. L., Marcuad L., Zajdela F., London I. M., Gros F., 1966
Patterns of RNA metabolism in a differentiated cell: A rapidly labeled, unstable 60 S RNA with messenger properties in duck erythroblasts.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 1571 - 1578
87. Schweiger H. G., 1962
Pathways of metabolism in nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201

88. Scott A. E., Bunn M. R., Brush A. H., 1977
The phylogenetic distribution of red cell 2,3-
diphosphoglycerate and its interaction with
mammalian hemoglobins.
J. Exp. Zool. 201, 269 - 288

89. Sohmer P. R., Scott R. L., 1982
Phosphoenolpyruvate effects on fresh and stored
red blood cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 171, 24 - 33

90. Tosteson D. C., Johnson J., 1957a
The coupling of potassium transport with metabolism
in duck red cells.
J. Cell. Comp. Physiol. 50, 169 - 184

91. Warburg O., 1909
zitiert nach Kregenow F.M.; In: Membrane transport
in red cells,
Ellory J.C., Lew V.L. (eds.),
Acad. Press, London, New York, San Francisco,
383 - 426

92. Warburg O., 1910-11
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism
in nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201

93. Warburg O., 1911-12
Über Beziehungen zwischen Zellstruktur und
biochemischen Reaktionen I.
Pflügers Archiv 145, 277 - 282

94. Warburg O., Kubowitz F., Christian W., 1931
zitiert nach Schweiger H.G.; Pathways of metabolism in
nucleate and anucleate erythrocytes.
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201
95. Weiser M. B., Razin M., Stein W. D., 1983
Kinetic tests of models for sugar transport in human
erythrocytes and comparison of fresh and cold-stored cells.
Biochim. et Biophys. Acta 727, 367 - 378
96. Whitfield C. F., 1976
Sugar transport in reversibly hemolyzed erythrocytes.
Biochim. et Biophys. Acta 436, 199 - 209
97. Whitfield C. F., Morgan H. E., 1973
Effect of anoxia on sugar transport in avian erythrocytes.
Biochim. et Biophys. Acta 307, 181 - 196
98. Whitfield C. F., Rannels S. R., Morgan H. E., 1974
Acceleration of sugar transport in avian erythrocytes
by catecholamines.
Jour. of Biol. Chem. 249, 4181 - 4188
99. Whitfield C. F., Schworer M. E., 1981
Locus of N-ethylmaleide action on sugar transport
in nucleated erythrocytes.
Am. J. of Physiol. 0363 - 6143/81, C 34 - 41
100. Winkelmann W., 1963a
Einfluß von Schilddrüsenhormonen auf die Glucose-
aufnahme und die Atmung in Vogelerythrozyten in vitro.
Z. ges. Exp. Med. 136, 556 - 562
101. Wood R. E., Morgan H. E., 1969
Regulation of sugar transport in avian erythrocytes.
J. Biol. Chem. 244, 1451 - 1460

Für die Überlassung von Arbeitsmöglichkeiten zur Durchführung meiner Untersuchungen möchte ich dem geschäftsführenden Vorstand des Institutes, Herrn Prof. Dr. H. Zucker herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Dr.habil. J. Wittmann für die freundliche Überlassung des Themas und die jederzeit gerne gewährte Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Ferner möchte ich Frau B. Hofer für die stets hilfsbereite und freundliche technische Assistenz danken.

LEBENS LAUF

Günther Pfann

geboren am 30.03.1959 in Fürth

Eltern: Willi Pfann

Gertrud Pfann, geb. Riffelmacher

1969 - 1978 Besuch des Hardenberg-Gymnasiums in Fürth

Abitur 1978

1978 - 1984 Studium der Tiermedizin an der

Ludwig-Maximilian-Universität in München

1984 Approbation als Tierarzt

seit 1981 Doktorand am Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Ernährungs-
physiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

